

⑪ 公開特許公報 (A) 平1-254699

⑫ Int.Cl.

C 07 K 7/40
A 61 K 37/26
// C 07 K 99:26

識別記号 庁内整理番号

ADP 8318-4H
8615-4C

⑬ 公開 平成1年(1989)10月11日

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全5頁)

⑭ 発明の名称 インスリン誘導体及びその用途

⑮ 特願 昭63-83912

⑯ 出願 昭63(1988)4月5日

⑰ 発明者 村、西 昌三 京都府京都市上京区烏丸通一条上ル西入ル観三橋町562番地19号

⑱ 発明者 木曾 良明 大阪府茨木市稻葉町15番地26号

⑲ 出願人 小玉株式会社 東京都千代田区神田佐久間町3丁目2番地

⑳ 代理人 弁理士 専優美 外2名

明細書

インスリン誘導体に関するものである。

(従来の技術)

1. 発明の名称

インスリン誘導体及びその用途

2. 特許請求の範囲

- (1) インスリンB鎖のB₁又はB_{2..}のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸が結合したインスリン。
- (2) インスリンB鎖のB₁及びB_{2..}のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸が結合したインスリン。
- (3) 請求項第1項記載の化合物の薬理学的許容量を有効成分とする医薬組成物。
- (4) 請求項第2項記載の化合物の薬理学的許容量を有効成分とする医薬組成物。
- (5) 糖尿病治療剤である請求項第3項及び第4項のいずれか1項記載の医薬組成物。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規なインスリン誘導体、さらに詳しくは糖尿病における血糖降下剤として有用な

インスリンは脾臍のランゲルハンス氏島より分泌されるアミノ酸残基51個からなるペプチドで、血液中のグルコース値の調節を行っているホルモンである。何らかの原因で脾臍からのインスリン分泌の調整に異常を来すと、高血糖症状となり糖尿病と診断される。糖尿病患者は、放置しておくと、高血糖状態から種々の疾患を合併し死に至ることも多い。従って、この高血糖状態を正常化させるために、インスリンを投与し改善する必要がある。投与されるインスリンとしては、ウシ、ブタの脾臍から抽出精製されたもの成は、大腸菌を遺伝子組み換えによりヒト型のものとしたもの又はブタインスリンを酵素化学的にヒト型に変換したものが用いられている。

ヒトイインスリンとウシインスリン、ブタインスリンの相違は、下記一般式(I)で表わしたインスリン分子のA-鎖8と10(A₈とA₁₀)

のアミノ酸がアラニン及びバリンで、B-鎖30(B₃₀)がアラニンであるものがウシインスリンであり、B鎖30のアミノ酸がアラニン、A鎖8と10のアミノ酸がスレオニン及びイソロイシンよりなっているのがブタインスリンであり、A-鎖8、10のアミノ酸がスレオニン、イソロイシン、B-鎖30のアミノ酸がスレオニンよりなっているのがヒトインスリンである。

このようなヒト、ブタ又はウシインスリンを注射剤として患者に必要量皮下又は筋肉に投与し、血糖を調整している。

糖尿病患者はこのインスリン注射を毎日、一生の間施行しなければならず、注射に伴う疼痛や注射部位の変性など肉体的苦痛ははなはだ大きいものがある。

このようなインスリン注射に伴う苦痛を除くため、経口投与や経鼻、直腸投与などの方法が研究されている。

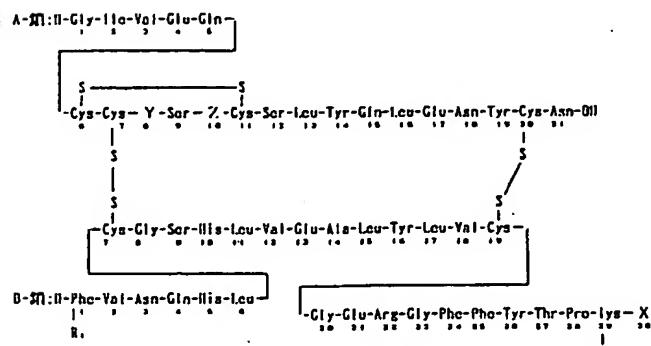
これらの方法は、何れも吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤等とインスリンとを製剤技術

することを目的とするものである。

(課題を解決するための手段)

その結果、本発明者は、インスリンの活性を失うことなく、血糖降下作用を示す、脂肪酸化インスリンとして新規な脂肪酸化インスリンを見い出し本発明を完成させた。

本発明の新規なインスリン誘導体は、一般式(I):



的に調査したものである。これらの例を挙げると、胰島細胞液と配合する方法(ダンフォースら: Endocrinology 65, 175, 1978)、乳化剤により油性乳剤とする方法(七田ら、Acta Diabet. Lat. 15, 175, 1978)、リボソームにする方法(Yoshida: EPA 140,085)、又インスリン粒子をアゾポリマーで被覆し消化酵素の分離されない大腸で放出させる方法がある(M. Saffran: Canadian J. Biochem., 57, 548, 1979)。

又、経皮的持続注入用インスリンとしては、脂肪化インスリン(米国特許第4478830号、第4478746号、第4483792号、第4489061号、第4489064号及び第4516572号明細書)が知られている。このものは、従来のインスリン注射剤では結晶が析出し、長期保存に耐えないことから種々の脂肪化インスリンとしたものである。

(発明が解決しようとする課題)

本発明は、医薬として許容される安定なインスリン製剤に適するインスリン誘導体を提供す

(式中R₁及びR₂は同一又は異って脂肪酸基を表わし、X及びYは同一でスレオニン又はアラニンを表わし、ZはX及びYがスレオニンのときイソロイシンを表わし、X及びYがアラニンのときバリンを表わす。)

又、式中Phe:フェニルアラニン、Ile:イソロイシン、Val:バリン、Glu:グルタミン酸、Gin:グルタミン、Cys:システイン、Ser:セリン、Leu:ロイシン、Tyr:チロシン、Asn:アスパラギン、His:ヒスチジン、Gly:グリシン、Ala:アラニン、Arg:アルギニン、Thr:スレオニン、Pro:プロリン、を表わす。)

で表わされる。

本発明化合物は糖尿病における血糖降下剤として有用である。

本発明の脂肪酸化インスリンは、上記一般式(I)で示すようにインスリンB鎖のB₁及びB₂₀のいづれか一方又は両方のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸を結合せしめたものである。

本発明においてインスリンは、ヒト、ブタ及びウシインスリンの何れも使用できる。

本発明において結合させる脂肪酸としては、炭素原子数7~21前後のものが好ましく、例えばカブリル酸、ペラルゴン酸、カブリン酸、ウンデシル酸、ラクリン酸、トリデシル酸、ミリスチン酸、ベンタデシル酸、パルミチン酸、ヘプタデシル酸、ステアリン酸、ノナデカン酸、フラキシン酸、ウンデシレン酸、オレイン酸、エライシン酸、セトレイン酸、エルカ酸、プラシジン酸、ソルビン酸、リノール酸、リノレイン酸が挙げられる。特に、パルミチン酸が好ましい。

本発明による化合物は、例えば以下のような方法で得ることができる。

工程(1): 脂肪酸の活性化エステルの合成

工程(2): インスリンのp-メトキシベンゾキカルボニルアシド(pMZ)化(pMZ-インスリンの生成)

工程(3): 脂肪酸活性エステルとpMZ-インス

リンとの結合

工程(4): pMZ基の除去

工程(5): 分離精製・保存

上記各工程について説明すると次のとおりである。

工程(1)の活性化エステルの合成は、脂肪酸そのものでは反応性がなく、そのままではインスリンと結合しないため、脂肪酸のカルボキシル基を活性化させ反応性を高めるために行なう。一具体例としては、N-ヒドロキシサクシミドエステルとする。

工程(2)のインスリンのp-メトキシベンゾキカルボニルアシド化は、インスリンA鎖中のアミノ酸(Gly:)特にA₁のアミノ基が脂肪酸によって置換されることにより、インスリンそのものの活性が低下をすることから、アミノ基の保護のためpMZ化を行なう。

工程(3)は工程(2)で得たpMZ-インスリンと工程(1)の活性脂肪酸エステルとの結

合反応で、この結合はジメチルホルムアミド溶媒中で、室温にて搅拌することにより容易に進行する。

工程(4)で工程(2)において導入した保護基であるpMZを、トリフルオロ酢酸により脱離させる。

工程(5)の精製はゲルろ過を行った後、高速液体クロマトグラフィーにより、インスリンB鎖のB₁及びB₂のいづれか一方のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸を結合せしめたもの(R₁又はR₂に脂肪酸が結合したインスリン)、B₁及びB₂の両方のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸を結合せしめたもの(R₁又はR₂に脂肪酸が結合したインスリン)を得る。

得られたインスリン誘導体は、二次改結乾燥し粉末として得ることができる。

(実施例及び試験例)

以下に本発明を実施例により説明するが、本発明はこれに限定されるものでない。

参考例1 脂肪酸活性化エステルの製法

酢酸エチル 150mLにパルミチン酸及びN-ヒドロキシサクシミド50mMを加えたのち、氷冷しながらジシクロヘキシルカルボン酸50mMを加え24時間搅拌する。反応終了後、反応液をろ過し、溶媒を留去したのち、残渣をエタノールより再結晶し、パルチニ酸N-ヒドロキシサクシミドエステルを得る。

参考例2. pMZ化インスリンの製法

ウシインスリン1mM及びp-メトキシベンゾキカルボニルアシド4mMを1N-炭酸水素ナトリウム溶液・水・ジメチルホルムアミド(2:3:4)の浴液に溶かし、室温で3時間搅拌する。反応終了後、50%酢酸を加え溶媒を留去する。残渣をエーテル及び1%酢酸で洗い、50%酢酸に溶かし改結乾燥してp-メトキシカルボン酸イミドインスリンを得た。

実施例

BEST AVAILABLE COPY

pM Z - インスリン 1 mM をジメチルホルムアミドに溶かし、これにバルミチン酸 N - ヒドロキシサクシミドエステル 50 mM を加え、室温で 3 時間攪拌する。反応後溶媒を留去し、残渣にアニソール及びトリフルオロ酢酸を加え水冷下 1 時間攪拌する。

その後トリフルオロ酢酸を留去し、残渣にエーテルを加え、生じた沈んでんをろ過し、残渣をエーテルで洗浄した。

得られた残渣を 1 N 酢酸に溶解し、セファデックス - G 25 を充てんしたカラムによりゲルろ過を行いインスリン画分を濃縮した。

インスリン画分を凍結乾燥した後、アセトニトリル : 0.3% トリフルオロ酢酸混液 (2 : 3) に溶かし、高速液体クロマトグラフィーにより、Lys-B₂₁・バルミトイインスリン (pal-1)、Phe-B₁・バルミトイインスリン (pal-2)、Phe-B₁ - Lys-B₂₁・ジバルミトイインスリン (pal-3) を得た。

高速クロマトグラムの結果を第 1 図に示す。

第 1 表 アミノ酸分析値

計算値	インスリン			脱アミノ化 pal-1 インスリン		
	未変性物	脱アミノ化物	pal-1	pal-2	pal-3	
Asp	3.03	3.03	3.47	3.12	3.05	
Thr	0.94	0.96	0.97	1.00	1.00	
Ser	2.54	2.71	3.05	2.80	2.71	
Glu	7.32	7.5	8.25	7.39	7.49	
Pro	1.15	1.23	1.00	1.09	1.09	
Gly	4.05	3.36	3.28	3.26	3.25	
Ala	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	
Cys	2.38	2.4	-	0.94	1.73	
Val	3.3	3.7	4.87	4.19	4.04	
Ile	0.31	0.28	0.62	0.53	0.55	
Leu	5.42	5.56	6.47	5.81	5.67	
Tyr	4.4	3.91	1.65	2.77	2.90	
Phe	3	2.58	2.21	2.94	2.83	2.21
Lys	1	0.95	0.09	0.05	0.69	0.79
His	2	1.96	1.93	2.09	1.94	2.01
Arg	1	1.1	1.69	1.92	1.89	1.61

す。

上記により得られたまたインスリン調導体の脂肪酸結合部位の同定は、該導体の脱アミノ化を行なった後、酸分解し、すべてのペプチド結合を切断して 51 個のアミノ酸に分解した後、アミノ酸分析計により分析した。

アミノ酸分析値を第 1 表に示す。表に示すようにインスリン（未変性物）には並難のアミノ基が 3 か所あり、これを脱アミノ化するとアミノ基が消失するためアミノ酸分析計で測定できないが、脂肪酸が結合していた場合脱アミノ化を受けないため、生インスリンと脱アミノ化物とを比較したとき脂肪酸が結合している部位のみ 1 つ多く出るため結合部位が同定できる。

実験例（血糖降下作用）

ウイスター系雄性ラットを絶食 24 時間後、ベントバルビタール麻酔下背位に固定し、被験薬剤を 1 N - 塩酸に溶解又は懸滴し、大網筋膜より静注又は大網筋肉筋に筋注した。投与量はインスリンとして 100 μg / 匹とした。投与後、頸動脈より採血し、血中グルコース量を測定した。

結果を第 2 図に示す。

図からわかるように、本発明のインスリン調導体 Pal-1 及び 2 は、顯著に血中グルコース値を低下させる。

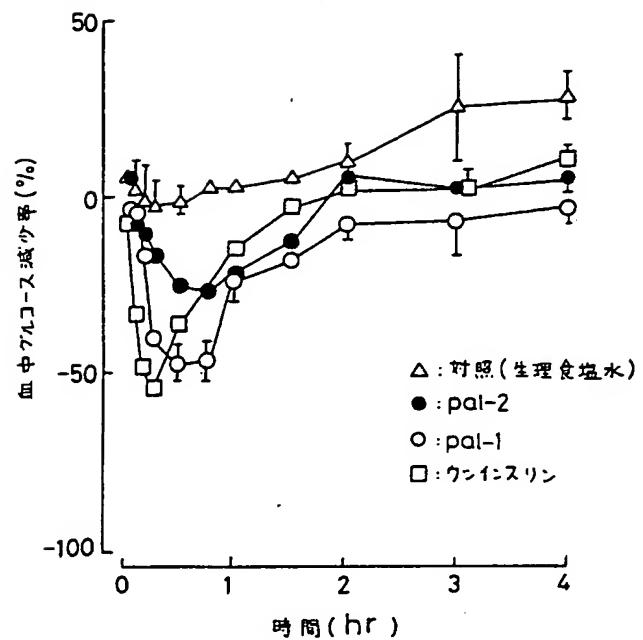
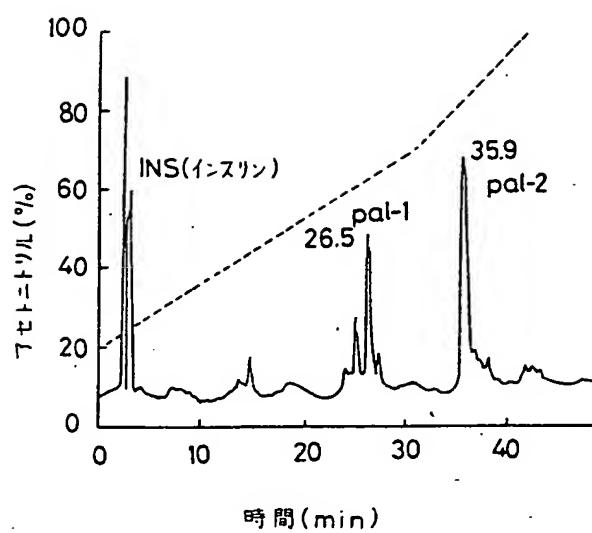
4. 図面の簡単な説明

第 1 図は高速液体クロマトグラムの結果を示すグラフ。

第 2 図は投与後の血中グルコール値の変化を示すグラフである。

図 2 図

図 1 図



BEST AVAILABLE COPY